亚洲玉米螟幼虫酚氧化酶原基因序列的生物信息学分析

冯从经[1,*]，陆剑锋[2]，黄建华[3]，郭晓丽[1]，桑守亮[1]
（1. 扬州大学园艺与植物保护学院植物保护系，江苏扬州 225009；2. 合肥工业大学生物与食品工程学院，合肥 230009；3. 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所，上海 200032）

摘要：酚氧化酶原 PPO 是昆虫免疫的关键酶，本文从生物信息学角度对亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* Guenée 幼虫 PPO 进行分析，为进一步研究其高级结构与功能的关系提供理论依据。利用我们已提交到 GenBank 的数据，采用在线分析及 MEGA4 和 RasMol 软件对亚洲玉米螟酚氧化酶原(Of-PPO)的核苷酸和氨基酸序列、系统发生关系和蛋白质三级结构进行分析。结果表明：Of-PPO 全长 cDNA 序列有 2 686 bp，包含一个 2 079 bp 的开放阅读框，其推导的 693 个氨基酸序列中包含 6 个组氨酸残基构成的 2 个铜离子结合位点，以及保守的硫羟酸酯区域。Of-PPO 属于 PPO2 类群，其 N 端不含信号肽，无跨膜结构域区域，无糖基化位点，44 个磷酸化位点均匀分布于整个多肽链中，有 2 段序列可能形成卷曲螺旋，有 5 个区域的氨基酸具较强疏水性，其二级结构中 α-螺旋占 22.54%，随机卷曲占56.79%。同源建模显示其三级结构为“α/β 型”中的“滚筒结构”，存在一个明显的空位，可能与该酶催化活性有关。本文可为 Of-PPO 的实验研究和应用开发提供有价值的信息。

关键词：亚洲玉米螟；酚氧化酶原；生物信息学分析；三级结构；同源建模
中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2009)10-1068-10

Bioinformatical analysis of prophenoloxidase from larvae of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* Guenée (Lepidoptera: Pyralidae)

FENG Cong-Jing[1,*], LU Jian-Feng[2], HUANG Jian-Hua[3], GUO Xiao-Li[1], SANG Shou-Liang[1] (1. Department of Plant Protection, College of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China; 2. College of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China; 3. Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract: Prophenoloxidase (PPO) is a key enzyme of insect immunity. In this study, the nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of PPO cloned from the larvae of *Ostrinia furnacalis* were analyzed and predicted by the tools of bioinformatics in the following aspects: the composition of nucleotide sequences and amino acid sequences, signal peptide, trans-membrane topological structure, hydrophobicity or hydrophilicity, secondary structure, tertiary structure, *etc*. The results showed that the full-length cDNA of *O. furnacalis* PPO (Of-PPO) consisted of 2 686 bp, containing an open reading frame (ORF) of 2 079 bp. Based on the 693 deduced amino acid sequences of Of-PPO, a putative thiolester site and two distinct copper binding regions were found, which included six histidine residues. Of-PPO belongs to the PPO2 group, and there is no signal peptide in the N-terminal region of the polypeptide chain. No possible transmembrane protein model was found. There was no O-glycosylation site in Of-PPO predicted with DictyoGlyc. Forty-four phosphorylation sites were predicted in the whole peptide by NetPhos 2.0 Server. Two regions of Of-PPO could form coil structures, and five regions were found with significant hydrophobic characteristics. The proportions of α-helix and random coil in the secondary structure of Of-PPO were 22.54% and 56.79%, respectively. The comparative modeling method was used to calculate the tertiary structure of Of-PPO, and the result showed that it was the “roller” shape, which belongs to the α/β type. The catalytic activity may relate with a large vacant space in Of-PPO structure analyzed by the RasMol

基金项目：国家自然科学基金项目(30571248)；扬州大学科技创新培育基金(2008CXJ028)
作者简介：冯从经，男，1974 年生，博士，副教授，从事昆虫生理生化研究
＊通讯作者 Author for correspondence, E-mail: fengcj@yzu.edu.cn
收稿日期 Received: 2009-05-08；接受日期 Accepted: 2009-07-08

software. This study may provide valuable information for further research on Of-PPO.
Key words: *Ostrinia furnacalis*; prophenoloxidase; bioinformatical analysis; tertiary structure; comparative modeling

无脊椎动物，包括昆虫都没有脊椎动物所具有的获得性免疫反应能力，但它们拥有高效的先天性免疫反应系统。昆虫的先天性免疫系统包括体液免疫和细胞免疫两部分，它们协同作用来吞噬和清除血淋巴中的外源入侵物（Franssens *et al.*, 2008）。酚氧化酶（phenoloxidase, PO），又称酪氨酸酶（tyrosinase），是节肢动物先天性免疫系统关键酶之一，PO 以无活性的酚氧化酶原（prophenoloxidase, PPO）形式存在，PPO 通过微生物细胞壁成分中糖类，如 β-1, 3-葡聚糖、肽聚糖和脂多糖来引发丝氨酸蛋白酶的级联反应而表现出 PO 活性（Söderhäll and Cerenius, 1998）。在昆虫体内，PO 是含铜离子的酶，可催化酪氨酸羟基化形成 3, 4-二羟基苯丙氨酸（DOPA）以及氧化酚类物质形成醌，进一步合成黑色素。在先天性免疫反应中，黑色素在昆虫抵御较大病原微生物和寄生物的过程中起至关重要的作用（Ling and Yu, 2005）。PO 可参与昆虫的体壁硬化、伤口愈合和对病原微生物及外源寄生物的隔离、包囊等诸多重要生理活动（Chase *et al.*, 2000）。最近，Tsao 等（2009）还认为 PPO 与白腹丛蚊 *Armigeres subalbatus* 的形态发生有关。

Aspán 等（1995）首次在中华绒螯蟹 *Pacifastacus leniusculus* 中克隆了 PPO 基因，迄今已在超过 42 种节肢动物中获得 87 个 PPO 基因序列（Ai *et al.*, 2009）。在许多昆虫种中通常包括 2 个或更多个 PPO 基因，例如，在冈比亚安蚊 *Anopheles gambiae* 中有 9 个 PPO 基因，果蝇 *Drosophila melanogaster*（Cerenius and Söderhäll, 2004）和寄生蜂 *Pimpla hypochondriaca*（Parkinson *et al.*, 2001）中有 3 个，家蚕 *Bombyx mori*（Yamamoto *et al.*, 2000）和烟草天蛾 *Manduca sexta*（Jiang *et al.*, 1997）中有 2 个，但在甲壳类动物中大多仅有 1 个 PPO 基因，这种多态性的意义尚不清楚，可能不同 PPO 承担不同的生理功能。Aspán 等（1995）将中华绒螯蟹 PPO cDNA 推导的氨基酸序列与脊椎动物、微生物体内的酪氨酸酶及节肢动物的血蓝蛋白（hemocyanin）氨基酸序列进行比较，认为酚氧化酶原在结构上可分为 3 个区域，即 N-端、C-端、中间保守的铜离子结合区。铜离子结合区富含组氨酸残基，有一对被称为 CuA 和 CuB 的铜离子结合点，它们各结合 1 个铜离子。每一个铜离子都与 3 个保守的组氨酸残基以配位键相连，形成与分子氧和酚类底物相互作用的活性部位。除了该铜离子结合位点外，PPO 与血蓝蛋白和其他含铜离子蛋白的序列相似性较低。通过对昆虫 PPO 与其他节肢动物的酪氨酸酶、血蓝蛋白序列进行生物信息学分析，进一步了解三者结构、功能和进化关系，有利于阐明 PPO 的作用机理。本文主要对已从亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* Guenée 幼虫体内克隆的 PPO 基因 cDNA 序列和推导的氨基酸序列进行有关组成成分、理化性质、结构特征和功能等生物信息学分析，为进一步揭示 PPO 功能提供有价值的信息。

1　材料与方法

1.1　数据库搜索及亚洲玉米螟 PPO 基因编码蛋白的理化性质分析

亚洲玉米螟幼虫 PPO（Of-PPO）的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列来源于我们已经提交到 GenBank 数据库（序列号：DQ333883）的序列。通过 National Center for Biotechnology Information（NCBI）的 BLASTp 程序、ORF Finder 以及 ProtParam 对序列进行在线比对，确定其完整编码框并预测蛋白质的理化性质，进行半衰期与稳定性评估；信号肽序列分析采用 SignalP 工具；蛋白质翻译后修饰的糖基化位点和磷酸化位点分析分别采用 DictyOGlyc 在线软件和 NetPhos 2.0 Server 分析；氨基酸序列的同源性比对用 Clustal W 在线工具完成；通过蛋白分析专家系统 Expasy 所提供的在线分析工具 ProtScale 分析蛋白的疏水性（表 1）（蒋彦等, 2003）。

1.2　亚洲玉米螟 PPO 基因编码蛋白的结构和功能分析

利用 GOR 在线工具完成蛋白质的二级结构预测；利用 Expasy 的 3djigsaw 工具向蛋白质立体结构数据库 PDB（Protein Data Bank）提交该蛋白质氨基酸序列，利用 RasMol 软件显示该蛋白的三维分子结构。利用在线工具 TMHMM 分析蛋白质跨膜结构域；利用 COILS 进行卷曲螺旋分析；利用 Pfam 进行 PPO 的结构域功能分析（表 1）（薛庆中, 2009）。

表 1 PPO 数据库和有关生物信息学分析软件的网址

Table 1 Websites of PPO database and the involved bioinformatical softwares

数据库/分析软件 Databases/Softwares	网址 Websites	备注 Note
GenBank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html	
BLASTp	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	采用 FASTA 格式，默认参数设置 FASTA sequence format with default parameter
ORF	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html	采用 FASTA 格式，默认参数设置 FASTA sequence format with default parameter
ProtParam	http://www.expasy.ch/tools/protparam.html	采用推导的氨基酸序列，默认参数设置 Deduced amino acid sequence with default parameter
ClustalW	http://www.ebi.ac.uk./Tools/clustalw2/index.html	采用 FASTA 格式，默认参数设置 FASTA sequence format with default parameter
SignalP	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/	采用 FASTA 格式，默认参数设置 FASTA sequence format with default parameter
DictyOGlyc	http://www.cbs.dtu.dk/services/DictyOGlyc/	采用推导的氨基酸序列，默认参数设置 Deduced amino acid sequence with default parameter
NetPhos	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/	采用 FASTA 格式，默认参数设置 FASTA sequence format with default parameter
ProtScale	http://www.expasy.ch/tools/protscale.html	采用推导的氨基酸序列，默认参数设置 Deduced amino acid sequence with default parameter
GOR	http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl? page = npsa_gor4.html	采用推导的氨基酸序列，默认参数设置 Deduced amino acid sequence with default parameter
3djigsaw	http://bmm.cancerresearchuk.org/~3djigsaw/	采用推导的氨基酸序列，默认参数设置 Deduced amino acid sequence with default parameter
TMHMM	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/	采用 FASTA 格式，默认参数设置 FASTA sequence format with default parameter
COILS	http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html	采用推导的氨基酸序列，默认参数设置 Deduced amino acid sequence with default parameter
Pfam	http://pfam.sanger.ac.uk/	采用推导的氨基酸序列，默认参数设置 Deduced amino acid sequence with default parameter

1.3 基于昆虫 PPO 核苷酸序列推导的氨基酸序列的系统进化树构建

以中华绒螯蟹 *P. leniusculus* PPO（X83494）为外群，对已经提交 GenBank 的各种昆虫中 42 条 PPO 氨基酸序列（表 2）构建系统树。采用 MEGA4 系统树构建软件构建有根系统树，采用邻位相连算法（neighbor-joining，NJ），1 000 次自举（bootstraping）进行进化树的可信度评估。

2 结果与分析

2.1 亚洲玉米螟幼虫 PPO 核苷酸序列、氨基酸序列组成和理化性质

经反转录建立亚洲玉米螟幼虫的 cDNA 文库，设计简并引物扩增后，采用 5′-RACE 和 3′-RACE，克隆得到 PPO 全长 cDNA 序列，克隆的亚洲玉米螟核苷酸序列和推导的氨基酸序列已经提交 GenBank（序列号：DQ333883）。亚洲玉米螟幼虫的全长 cDNA 序列有 2 686 bp，包含一个 2 079 bp 的开放阅读框（ORF），一个 73 bp 的 5′非编码区（5′UTR）和一个 534 bp 的带有加尾信号的 3′非编码区（3′UTR）。开放阅读框从第 74 个核苷酸开始，终止于第 2 152 个核苷酸，由其推导的氨基酸序列以甲硫氨酸为起始氨基酸，长为 693 个氨基酸。Of-PPO 的计算分子量约为 79.8 kDa，估测等电点 pI 为 5.72。Of-PPO 的半衰期为 30 h、不稳定系数为 49.73，化学分子式为 $C_{3549}H_{5437}N_{1001}O_{1050}S_{29}$，预测认为 Of-PPO 是一类不稳定蛋白，这些为 Of-PPO 蛋白质的分离纯化提供了基础数据。

表 2　GenBank 中用于构建系统树的 42 条昆虫 PPO 氨基酸序列

Table 2 Forty-two PPO amino acid sequences of insects in GenBank used to construct the phylogenetic tree

PPO	GenBank 登录号 GenBank accession no.	PPO	GenBank 登录号 GenBank accession no.
Aedes aegypti PPO1	AF292114	*Anopheles stephensi* PPO1	AY559300
Aedes aegypti PPO2	AF292113	*Anopheles stephensi* PPO	AF062034
Anopheles gambiae PPO1	AF004915	*Apis mellifera* PPO	AY242387
Anopheles gambiae PPO2	AF004916	*Armigeres subalbatus* PPO1	AF260567
Anopheles gambiae PPO3	L76038	*Armigeres subalbatus* PPO2	AF286468
Anopheles gambiae PPO4	AJ010193	*Armigeres subalbatus* PPO3	AY487171
Anopheles gambiae PPO5	AJ010194	*Armigeres subalbatus* PPO4	AY487172
Anopheles gambiae PPO6	AJ010195	*Armigeres subalbatus* PPO5	DQ862064
Anopheles gambiae PPO7	AJ459960	*Armigeres subalbatus* PPO6	DQ862065
Anopheles gambiae PPO8	AJ459961	*Bombyx mori* PPO1	D49370
Anopheles gambiae PPO9	AJ459962	*Bombyx mori* PPO2	D49371
Drosophila melanogaster PPO1	NM_057464	*Bombyx mori* PPO2f	AF178461
Drosophila melanogaster PPO3	NM_080021	*Holotrichia diomphalia* PPO1	AB079664
Galleria mellonella PPO1	AF336289	*Holotrichia diomphalia* PPO2	AB079665
Galleria mellonella PPO2	AY371489	*Hyphantria cunea* PPO1	U86875
Helicoverpa armigera PPO2	DQ114946	*Hyphantria cunea* PPO2	AF020391
Manduca sexta PPO1	AF003253	*Ostrinia furnacalis* PPO	DQ333883
Manduca sexta PPO	L42556	*Pimpla hypochondriaca* PPO1	AJ297596
Musca domestica PPO	AY494738	*Plodia interpunctella* PPO	AY665397
Sarcophaga bullata PPO1	AF161260	*Spodoptera litura* PPO	AY703825
Sarcophaga bullata PPO2	AF161261	*Tenebrio molitor* PPO	AB020738

2.2　亚洲玉米螟幼虫 PPO 核苷酸序列和氨基酸序列的多序列比对分析

经过在线基本局域联配搜索工具（Basic Local Alignment Search Tool，BLAST）分析，发现 Of-PPO 的氨基酸序列与鳞翅目大蜡螟 *Galleria mellonella* PPO2、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* PPO2、烟芽夜蛾 *Helicoverpa armigera* PPO2、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* PPO 和草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* PPO2 氨基酸序列的联配得分很高，具有较高的同源性，其氨基酸一致性在 76% 以上（表 3）。

表 3　亚洲玉米螟与其他昆虫 PPO 基因氨基酸序列的 BLASTp 分析

Table 3 The BLASTp analysis of the amino acid sequences of PPO genes from *Ostrinia furnacalis* and other insects

PPO	GenBank 登录号 GenBank accession no.	一致性（%） Identity	PPO	GenBank 登录号 GenBank accession no.	一致性（%） Identity
Galleria mellonella PPO2	AY371489	79	*Sarcophaga bullata* PPO	AF161260	54
Helicoverpa armigera PPO2	DQ114946	78	*Plodia interpunctella* PPO	AY665397	54
Helicoverpa armigera PPO2	ABW65701	78	*Bombyx mandarina* PPO2	ABW06580	53
Spodoptera exigua PPO	ABS59653	78	*Manduca sexta* PPO1	AF003253	53
Spodoptera frugiperda PPO2	ABB92835	76	*Holotrichia diomphalia* PPO-Ⅱ	BAC15603	53
Choristoneura fumiferana PPO2	ABW16862	76	*Helicoverpa armigera* PPO1	ABH10016	53
Bombyx mori PPO2	D49371	75	*Drosophila melanogaster* PPO A3	BAB43866	53
Bombyx mori PPO-2f	AF178461	75	*Tenebrio molitor* PPO	AB020738	53
Bombyx mori PPO-2s	NP_0011062818	75	*Bombyx mori* PPO1	D49370	52
Spodoptera litura PPO	AY703825	75	*Anopheles gambiae* PPO	AAC27383	52
Hyphantria cunea PPO2	AF020391	73	*Apis mellifera* PPO	AY242387	52
Musca domestica PPO	AY494738	55	*Galleria mellonella* PPO	AAK64363	52
Spodoptera frugiperda PPO1	ABB92834	54	*Choristoneura fumiferana* PPO1	ABW16859	52

经过在线 Clustal W 对 Of-PPO 氨基酸序列进行分析，结果表明：Of-PPO 中包含 6 个组氨酸残基（H 213，H 217，H 243，H 366，H 370，H 406）构成的 2 个铜离子结合位点（图 1 中下划线所示区域），IGVNLHHWHWHLVYPFTATDRSIVAKDRRGELFFYMHQQIIARY（图 1：A）和序列 SLHNNGHSFTAYMHDPNHRYLESFGVMADEATTMRDPFFYRWHAFIDDIFQKHK（图 1：B）。还包含一个类似于脊椎动物的 α-巨球蛋白和补体蛋白 C_3 和 C_4 的硫羟酸酯区域（双下划线所示区域）（图 1：C）。

```
A  Ha-PPO2    VIPQNVPRTPIIIPRDYTATDLEEEHRLAYFREDIGVNLHHWHWHLVYPFTASQRAIVAK 238
   Sl-PPO     VLPQNVPRIPIIIPRDYTATDLEEEHRLAYWREDIGVNLHHWHWHLVYPFTASQRSIVAK 236
   Bm-PPO2    VIPPDVPRIPIIIPRDYTATDLEEEHRLAYWREDIGINLHHYHWHLVYPFTANDLSIVAK 232
   Bm-PPO2f   VIPPDVPRIPIIIPRDYTATDLEEEHRLAYWREDIGINLHHYHWLLVYPFTANDLSIVAK 232
   Ms-PPO     VIPKTIPRTPIIIPRDYTATDLEEEHRLAYWREDLGINLHHWHWHLVYPFSASDEKIVAK 234
   Gm-PPO2    VFPRGIPRTPIIIPRDYTATDLEEEHRLAYWREDIGINLHHWQWHLVYPFTASDRSIVAK 232
   Of-PPO     VVPQNIPRIPIIIPRDFTASDLESEHRLAYFREDIGVNLHHWHWHLVYPFTATDRSIVAK 232
   Gm-PPO1    VNASGN-RMPITIPTNYTASNSEPEQRVAYFREDIGINLHHWHWHLVYPFEAAR-EIVKK 227
              * .      * **  **  ::**::  *  *:*:**:***:*:****::*  ***** *     ** *

   Ha-PPO2    DRRGELFFYMHQQLIARYNGERLNNSLKRVKKFSNWREPIPEAYFPKLDSLTSSRGWPPR 298
   Sl-PPO     DRRGELFFHMHQQLIARYNCERLNHSLKRVKKFSNWREPIPEAYFPKLDSLTSARGWPPR 296
   Bm-PPO2    DRRGELFFYMHQQVIARFNCERLCNSLKRVKKFSNWREPIPEAYFPKLDSLTSSRGWPPR 292
   Bm-PPO2f   DRRGELFFYMHQQVIARFNCERLCNSLKRVKKFSNWREPIPEAYFPKLACLTSSRGWPPR 292
   Ms-PPO     DRRGELFFYMHQQIIARYNCERLCNSLKRVKKFSDWREPIPEAYYPKLDSLTSARGWPPR 294
   Gm-PPO2    DRRGELFFYMHQQIIARYNCERINNSLKRVKKFNNWREPIPEAYFPKLDSLTSSRGWPPR 292
   Of-PPO     DRRGELFFYMHQQIIARYNCERLNNNLKRVEKFSNWREPIPEAYFPKLDSLTSSRGWPPR 292
   Gm-PPO1    DRRGELFYYMHQQIIARYNAERLCNGLGRVTRYSDFRAPIGEGYFPKLDSQVASRSWPPR 287
              *******::****:***:* **:  :.* **  ::.::* ** *.*:***  .  .::*.****

B  Ha-PPO2    MLEASILSPNRELYGSIHNNGHSFSAYIHDPTHRYLESFGVIADEATTMRDPFFFRWHAW 414
   Sl-PPO     MLEASILSPNRELYGSIHNNGHSFAAYMHDPTHRYLESFGVIADEATTMRDPFFYRWHAW 412
   Bm-PPO2    MLESSALSPNRELYGSIHNNGHSFTAYMHDPEHRYLEQFGVIADEATTMRDPFFYRWHAY 408
   Bm-PPO2f   MLESSALSPNRELYGSIHNNGHSFTAYMHDPEHRYLEQFGVIADEATTMRDPFFYRWHAY 408
   Ms-PPO     MMEASVLSPNRDLYGSIHNNMHSFSAYMHDPEHRYLESFGVIADEATTMRDPFFYRVHAW 410
   Gm-PPO2    MVEASILSPNRELYGSVHNNGHSFSAYVHDPSHRYLENFGVIADEATTMRDPFFYRWHAW 408
   Of-PPO     MMEASILSPNRDLYGSLHNNGHSFTAYMHDPNHRYLESFGVMADEATTMRDPFFYRWHAF 408
   Gm-PPO1    LMESSILSLNRGYYGDLHNMGHVFIAYSHDPDHRHLEEYGVMGDSATAMRDPVFYRWHAY 407
              ::*:* ** **   **.:**  * * ** *** **:**.:**:.*.**:****.*:* **:

   Ha-PPO2    IDDICQKHKESSY-VRPYTRSELENPGVSVTSVSVETQGGQPNTLNTFWMSSDVDLSRGL 473
   Sl-PPO     IDDTCQRHKESAY-VRPYTRSELENPGVQVTSVSVETAGGQPNTLNTFWMSSDVDLSKGL 471
   Bm-PPO2    IDDVFQKHKESAY-VRPYTRSELENPGVQVRSVSVETPGGQPNTLNTFWMLSDVNLSRGL 467
   Bm-PPO2f   IDDVFQKHKESAY-VRPYTRSELENPGVQVRSVSVETPGGQPNTLNTFWMLSDVNLSRGL 467
   Ms-PPO     VDDIFQSFKEAPHNVRPYSRSQLENPGVQVTSVAVESAGGQQNVLNTFWMQSDVNLSKGL 470
   Gm-PPO2    VDDLFQKHKESNF-VRPYSRSELENPGVQVTSVSVETQGSPQNVLSTFWMSSDVDLSRGL 467
   Of-PPO     IDDIFQKHKESTF-VRPYSNSELGNPGVRVMSASIETQGGNQNELSTFWMSSDVDLSRGL 467
   Gm-PPO1    IDDIFNLYKSKLT---PYGDSQLDYPGIRVSSISVEGPAG-ANRFATQWQQSLVELSQGL 463
              :**  : .*.        **  *:*  **: * * ::*  ..  * : * *  * *:**:**

C  Ha-PPO2    MFIEMDRFVVPLNAGQNTITRLSTESSVTIPFEQTFRDLSVQSNDPRRPNLAEFNFCGCG 592
   Sl-PPO     MFIEMDRFVQPLNAGQNTITRNSTDSSVTIPFEQTFRDLSPQGSDPRRTSLAEFNFCGCG 590
   Bm-PPO2    MCIEMDRFVTVLNAGENNIVRQSTESSITIPFEQTFRDLSAQGNDPRRDELATFNYCGCG 586
   Bm-PPO2f   MCIEMDRFVTVLNAGENNIVRQSTESSITIPFEQTFRDLSAQGNDPRRDELATFNYCGCG 586
   Ms-PPO     MFIEMDRFVVPLSAGENTITRQSTESSLTIPFEQTFRDLSIQGSDPRRSELAAFNYCGCG 589
   Gm-PPO2    MFIEMDRFVTPLKAGENTITRQSTESTFTIPFEQTFRDLSVQADDPRRVDLAAFNFCGCG 586
   Of-PPO     MFIEMDRFVTPLNAGQNRIVRQSTEPTFTIPFEQTFRDLSVQGEDPRQVDLAAFNFCGCG 586
   Gm-PPO1    LMIELDKFTRGLKPGNNTIRQRSLDSSVTIPFERTFRNQANRPGDPGSATAAEFDFCGCG 583
              : **:*:*.  *..*:* * : * :.:.*****:***: : :   **      * *::****

   Ha PPO2    WPQHMLVPKGTEAGAAYQLFVMLSNYDLDSVEQPDGS-QLSCVEASSFCGLKDRKYPDRR 651
   Sl PPO     WPQHMLVPKGTEAGAAYQLFVMLSNYDLDSVDQPGGN-QLSCVEASSFCGLKDKKYPDRR 649
   Bm PPO2    WPQHMLVPKGTEAGMPFQLFVMLSNYDLDRIDQDDGK-QLTCVEASSFCGLKDKKYPDRR 645
   Bm PPO2f   WPQHMLVPKGTEAGMPFQLFVMLSNYDLDRIDQDNGK-QLTCVEASSFCGLKDKKYPDRR 645
   Ms PPO     WPQHMLVPKGTVGGVAYQLFVMLSNYELDKIEQPDGR-ELSCVEASMFCGLKDKKYPDAR 648
   Gm PPO2    WPQHMLVPKGTEAGAPYVFFVMLSNYDLDRIDEPGNSPEISCKEASSFCGLRDRKYPDKR 646
   Of PPO     WPQHMLVPKGSEAGSPYVLFVMLSNYEFDAVERTDGR-QATCKEASSFCGIRDSLYPDKR 645
   Gm PPO1    WPHHMLIPKGTEQGYPVVLYVMVSDWNADKIEQDTVG---ACNDAASYCGLRDRKYPDKR 640
              **:***:***:   *  .   ::**:*::: * ::.        :* :*: :**::*   *** *
```

图 1　亚洲玉米螟与几种鳞翅目昆虫已知 PPO 氨基酸序列的 Clustal W 分析

Fig. 1　Amino acid sequence comparison of the known PPO from several lepidopteran insects with *Ostrinia furnacalis* PPO by Clustal W

"＊"表示 8 个序列完全相同部分 Asterisks（＊）mark the positions of amino acid residues conserved in all eight sequences；"："表示观察到的保守替换 Indicates conservative substitutions；"."表示观察到的半保守替换 Indicates semi-conservative substitutions. Ha-PPO2：棉铃虫 *Helicoverpa armigera* PPO2（DQ114946）；Sl-PPO：斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* PPO（AY703825）；Bm-PPO2：家蚕 *Bombyx mori* PPO2（D49371）；Bm-PPO2f：家蚕 *Bombyx mori* PPO2f（AF178461）；Ms-PPO：烟草天蛾 *Manduca sexta* PPO（L42556）；Gm-PPO2：大蜡螟 *Galleria mellonella* PPO2（AY371489）；Gm-PPO1：大蜡螟 *Galleria mellonella* PPO1（AF336289）；Of-PPO：亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* PPO（DQ333883）。单划线区域表示两个铜离子结合位点（CuA 和 CuB），双下划线区域表示硫羟酸酯区域。The two copper binding domains（CuA and CuB）in the amino acid sequences are underlined. The putative thiolester sites are double underlined.

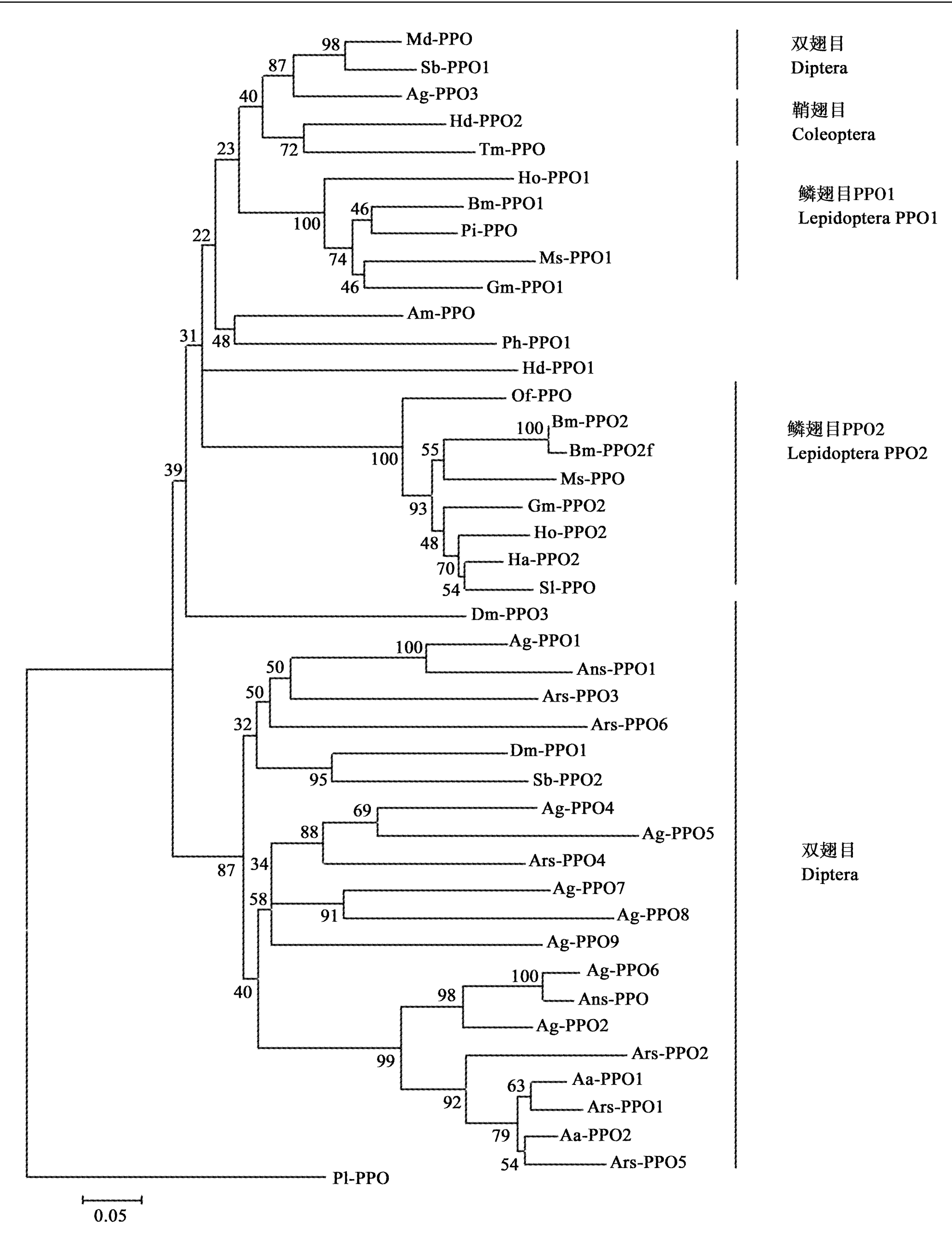


图 2　基于邻位相连算法(NJ)建立的昆虫中 42 种 PPO 氨基酸序列的有根系统树

Fig. 2　Neighbor-joining phylogenetic tree of forty-two PPO amino acid sequences from some species of Crustacea and Insecta, based on Poisson-corrected protein distances

甲壳纲 Crustacea：Pl-PPO：中华绒螯蟹 *Pacifastacus leniusculus*（X83494）. 昆虫纲 Insecta：Aa-PPO1，Aa-PPO2：埃及伊蚊 *Aedes aegypti*（AF292114，AF292113）；Ag-PPO1，Ag-PPO2，Ag-PPO3，Ag-PPO4，Ag-PPO5，Ag-PPO6，Ag-PPO7，Ag-PPO8，Ag-PPO9：冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*（AF004915，AF004916，L76038，AJ010193，AJ010194，AJ010195，AJ459960，AJ459961，AJ459962）；Am-PPO：西方蜜蜂 *Apis mellifera*（AY242387）；Ars-PPO1，Ars-PPO2，Ars-PPO3，Ars-PPO4，Ars-PPO5，Ars-PPO6：骚扰阿蚊 *Armigeres subalbatus*（AF260567，AF286468，AY487171，AY487172，DQ862064，DQ862065）；Ans-PPO，Ans-PPO1：斯氏按蚊 *Anopheles stephensi*（AF062034，AY559300）；Bm-PPO1，Bm-PPO2，Bm-PPO2f：家蚕 *Bombyx mori*（D49370，D49371，AF178461）；Dm-PPO1，Dm-PPO3：黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*（NM_057464，NM_080021）；Gm-PPO1，Gm-PPO2：大蜡螟 *Galleria mellonella*（AF336289，AY371489）；Ha-PPO2：棉铃虫 *Helicoverpa armigera*（DQ114946）；Hc-PPO1，Hc-PPO2：美国白蛾 *Hyphantria cunea*（U86875，AF020391）；Hd-PPO1，Hd-PPO2：东北大黑鳃金龟 *Holotrichia diomphalia*（AB079664，AB079665）；Md-PPO：家蝇 *Musca domestica*（AY494738）；Ms-PPO，Ms-PPO1：烟草天蛾 *Manduca sexta*（L42556，AF003253）；Of-PPO：亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis*（DQ333883）；Ph-PPO1：*Pimpla hypochondriaca*（AJ297596）；Pi-PPO：印度谷螟 *Plodia interpunctella*（AY665397）；Sb-PPO1，Sb-PPO2：麻蝇 *Sarcophaga bullata*（AF161260，AF161261）；Sl-PPO1：斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*（AY703825）；Tm-PPO：黄粉虫 *Tenebrio molitor*（AB020738）. 分支线上数值代表沿分支进化的百分率，采用邻位相连算法通过 1 000 次重复自举法分析测定了内部分支的值。刻度线表示每个位点存在 0.05 个氨基酸替换的系统发生距离。Numbers at tree nodes refer to bootstrap values from 1 000 replications. Scale bar refers to a phylogenetic distance of 0.05 amino acid substitutions per site.

2.3　昆虫 42 条主要 PPO 基因的系统进化树构建

采用 MEGA4 系统树软件对各种昆虫 PPO 氨基酸序列基于邻位相连法构建了系统树(图 2)，在系统树中有 5 个严格的姊妹群，包括 2 个双翅目类群、2 个鳞翅目类群和 1 个鞘翅目类群，其中蚊虫类双翅目类群远离其他昆虫类群，在鳞翅目昆虫可以分为 2 个类群，分别是 PPO1 和 PPO2 两种同工酶类群，其中 Of-PPO 属于 PPO2 类群。PPO 系统树的结果与传统的昆虫分类概念一致。

2.4　信号肽、跨膜结构域及翻译后修饰分析

进行信号肽分析有助于蛋白质功能域的区分及蛋白质细胞定位。根据 SignalP 分析，以 0.5 分为阈值，Of-PPO 的 C 分值、Y 分值和 S 分值分别在 19，3 和 1 位点，分别为 0.105，0.035 和 0.171，其信号肽计算结论为"NO"，表明其 N 端不含信号肽(图 3)。当然也可以怀疑信号肽可能位于 C 端，这尚需要一些细胞生物学实验数据来证明。

跨膜结构域是膜中蛋白和膜脂相结合的主要部位，它可能作为膜受体起作用，也可能定位于膜的锚定蛋白或离子通道蛋白等，通过跨膜结构域预测可以正确认识蛋白质结构、功能及在细胞中的作用部位。作者利用 TMHMM 分析软件对 Of-PPO 的跨膜结构域进行分析，结果表明：Of-PPO 的整条肽链都位于膜外，不存在跨膜结构域(图 4)。DictyOGlyc 预测表明 Of-PPO 无糖基化位点(图 5)。NetPhos 2.0 Server 磷酸化位点分析结果表明 Of-PPO 分值 > 0.5 的磷酸化位点有：丝氨酸(Ser)磷酸化位点 26 个，苏氨酸(Thr)磷酸化位点 12 个，酪氨酸(Tyr)磷酸化位点 6 个，计 44 个磷酸化位点，这些位点均匀分布于整个多肽链中(图 6)。作者推测认为 Of-PPO 在核糖体合成后，经过翻译加工成为成熟蛋白质，可能通过细胞破裂释放进入胞间液中。

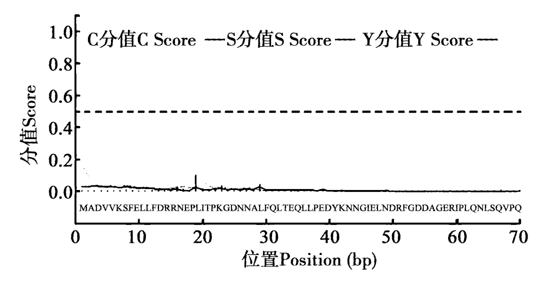


图 3　亚洲玉米螟 PPO 氨基酸序列的信号肽预测分析

Fig. 3　SignalP prediction of the amino acid sequence of PPO from *Ostrinia furnacalis*

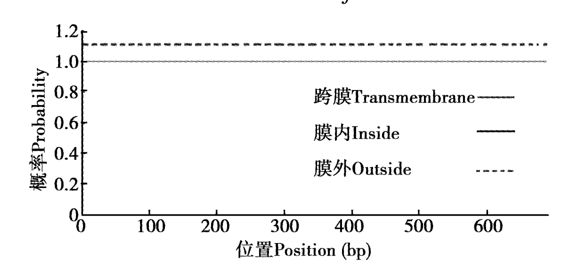


图 4　亚洲玉米螟 PPO 氨基酸序列的跨膜结构域 TMHMM 分析

Fig. 4　Transmembrane probabilities of the amino acid sequence of PPO from *Ostrinia furnacalis* with TMHMM analysis

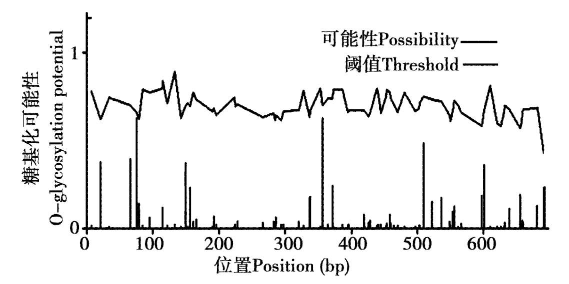


图 5　亚洲玉米螟 PPO 氨基酸序列的糖基化位点分析

Fig. 5　*O*-glycosylation site predication of the amino acid sequence of PPO from *Ostrinia furnacalis*

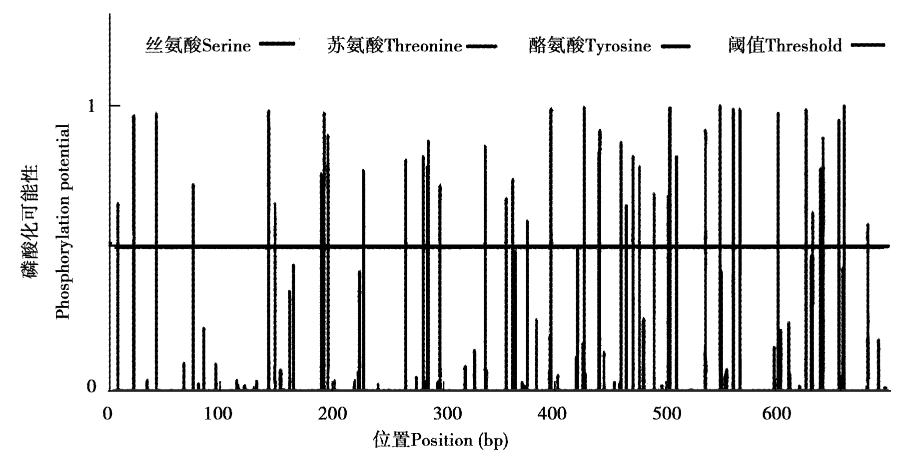


图 6　亚洲玉米螟 PPO 氨基酸序列的磷酸化位点分析

Fig. 6　Phosphorylation site predication of the amino acid sequence of PPO from *Ostrinia furnaclais*

2.5　亚洲玉米螟 PPO 基因编码蛋白的二级结构、卷曲螺旋与疏水性分析

蛋白质的高级结构决定其生物学功能，而高级结构则由一级结构即氨基酸顺序决定，氨基酸的多肽链通过折叠和卷曲形成稳定的空间结构，从而形成特有的生物学活性及理化性质，据此作者利用 GOR 在线工具完成蛋白质的二级结构预测。结果表明：α-螺旋占 22.54%，随机卷曲占 56.79%，它们是 Of-PPO 最大量的结构元件，而延伸链占20.66%，散布在整个蛋白质中，无 β 转角存在(图 7)。

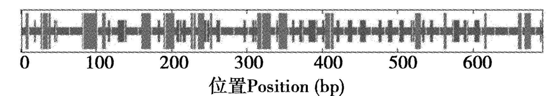


图 7　亚洲玉米螟 PPO 氨基酸序列的二级结构分析

Fig. 7　Secondary structure predication of the amino acid sequence of PPO from *Ostrinia furnacalis*

卷曲螺旋是控制蛋白质寡聚化的元件，也是一种很简单的三级结构。通过窗口 14 的搜索，PPO 有两段序列可能形成卷曲螺旋，通过跨膜结构分析证明这段序列并不是一个跨膜结构，可能是 PPO 的其他功能域(图 8)。

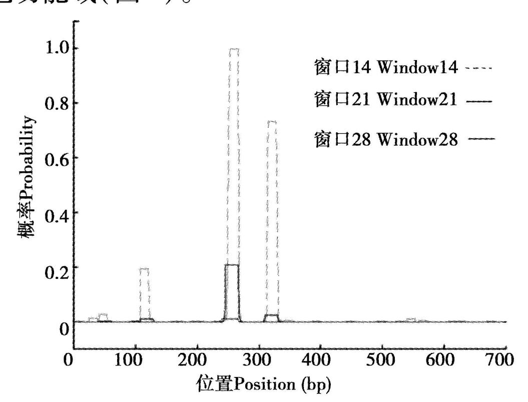


图 8　亚洲玉米螟 PPO 氨基酸序列的卷曲螺旋情况分析

Fig. 8　Coils for the amino acid sequence of PPO from *Ostrinia furnacalis*

疏水性是氨基酸的一种重要性质，疏水性氨基酸倾向于远离周围水分子，将自己包埋进蛋白质的内部，这一趋势加上空间立体条件和其他一些因素最终决定了一个蛋白质折叠形成的三维空间构象(杨琦，2008)。通过分析可以得到 Of-PPO 的亲疏水区域，这一结果一方面为二级结构预测结果提供参考，另一方面还可为结构域及功能域的划分提供依据。ProtScale 预测结果表明：PPO 疏水性最大值为 1.889，最小值为 −2.678，整个多肽链中大多数氨基酸的分值较低，亲水性氨基酸多于疏水性氨基酸。在 1～10、100～150、180～190、330～350、560～610 等区域的氨基酸具有较强疏水性，这些区域大部分被预测为 α-螺旋区，而相应预测为随机卷曲区的疏水性很低(图 9)。

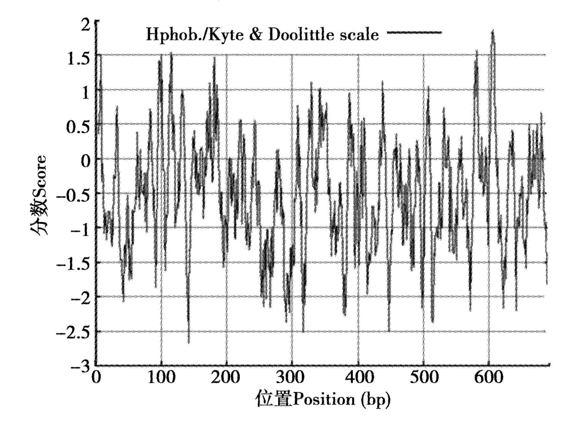


图 9　亚洲玉米螟 PPO 氨基酸序列的疏水性分析

Fig. 9　Hydrophobic character predication of the amino acid sequence of PPO from *Ostrinia furnacalis*

2.6　三级结构模型构建与功能结构域分析

三级结构是蛋白质结构预测的最终目的，要充分研究蛋白质的功能，就需把蛋白质的高级结构研究清楚。从氨基酸序列预测三级结构的技术很多，其中之一是同源建模，它通过比较未知结构蛋白质序列与已知结构的蛋白质序列来预测蛋白质结构。可以通过同源建模以击中序列的已知结构为模板，对蛋白质进行精确的结构模型构建。作者利用 Expasy 的 3djigsaw 工具向蛋白质立体结构数据库 PDB(Protein Data Bank)提交 Of-PPO 氨基酸序列，利用 RasMol 软件显示该蛋白的三维分子结构(图 10)。由图可知 Of-PPO 的模拟三维结构为“α/β 型”中的“滚筒结构”，存在一个明显的空位。

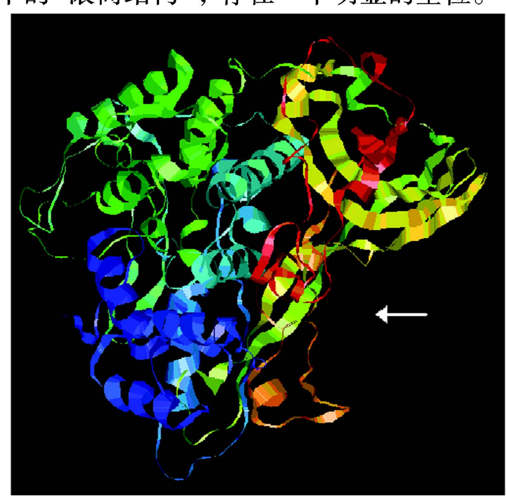


图 10　亚洲玉米螟 PPO 蛋白三级结构的同源建模

Fig. 10　The comparative modeling of the tertiary structure of PPO from *Ostrinia furnacalis*

箭头表示空位 The arrow indicates a vacant space.

通过 Pfam 在线分析，Of-PPO 存在 2 个功能结构域，分别为血蓝蛋白 M(hemocyanin-M)和血蓝蛋白 C(hemocyanin-C)(图 11)。血蓝蛋白在节肢动物的甲壳纲中有广泛分布，在昆虫纲中仅在蝗虫胚胎中发现其分布(Sánchez *et al.*, 1998)，它是一种具有携氧能力的六聚体蛋白，Pfam 预测结果表明：Of-PPO 与血蓝蛋白在系统进化上相近。但 Of-PPO 是否还有免疫功能以外的其他新的功能尚需通过实验进一步证实。

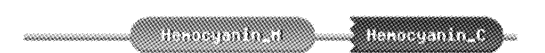


图 11 亚洲玉米螟 PPO 蛋白的功能结构域分析
Fig. 11 The functional domain analysis of the amino acid sequence of PPO from *Ostrinia furnaclais*

3 讨论

近年来，随着基因组和功能基因组研究的迅猛发展，生物信息学的理论和方法也取得长足进步，基于生物学实验数据和现代计算技术相结合的生物信息学分析在昆虫学研究领域也得到了广泛应用。作为无脊椎动物免疫防御的重要组成部分，PPO 激活系统所起的作用至关重要。为深入阐述昆虫的免疫防御机制，很有必要对涉及昆虫免疫和许多生理功能的 PPO 基因进行克隆和性质分析。本文对我们克隆的亚洲玉米螟 PPO 全长 cDNA 序列进行了生物信息学分析，为进一步阐明昆虫中 PPO 系统发生及功能分析提供了依据。

与其他昆虫中已知的 PO 一样，亚洲玉米螟幼虫的 PO 首先也是以其酶原 PPO 形式存在。一旦昆虫遭受外源病原微生物的入侵，PPO 就会在剪切位点被剪切，通过类似于脊椎动物的补体系统的丝氨酸蛋白酶级联反应转换为 PO。在亚洲玉米螟 PPO 的氨基酸序列中也存在其他昆虫所具有的由 6 个组氨酸组成的 2 个铜离子结合位点，以及硫羟酸酯样基序区域，这些保守的结构域和基序与其他昆虫中的 PPO 有很高的同源性，这说明亚洲玉米螟 PPO 属于 PPO 家族的成员之一。作者通过系列柱层析的方法从亚洲玉米螟幼虫血淋巴中纯化得到了 PPO 蛋白，并采用圆二色谱测定了纯化蛋白的二级结构，结果表明：在 25℃条件下，Of-PPO 中 α-螺旋占 37.28%，β 折叠占 17.00%，β 转角占 14.33%，随机卷曲占 31.38%，这一结果与在线预测的 Of-PPO 含有 22.54% α-螺旋和 20.66% 延伸链有较大差异，这可能与测定时 Of-PPO 蛋白所处缓冲液的微环境有关(Feng *et al.*, 2008)。

Matoba 等(2006)采用两种不同的结晶条件获得了抗生链霉菌 *Streptomyces castaneoglobisporus* 的与蛋白 ORF378 耦联酪氨酸酶晶体，通过 X 射线衍射反常散射法解析了该复合体的晶体结构，他们发现酪氨酸酶以 4 个 α-螺旋结构作为该酶中心，在 α-螺旋结构之中容纳了具有催化功能的双核铜离子中心，其活性中心的 2 个铜离子分别与 6 个组氨酸残基协调作用，共同执行催化功能，在该酪氨酸酶活性中心的上方明显存在 1 个大的空位。我们采用 BLASTp 对抗生链霉菌酪氨酸酶推导的氨基酸序列与 Of-PPO 进行两两比对，结果表明尽管其一致性仅为 22%，但却具有高度保守的铜离子结合位点。对 Of-PPO 的三级结构同源建模结果表明也存在一个类似的明显空位，可能以此空位形成一个底物结合的口袋，从而行使该酶催化中心功能，此结果也说明我们同源建模的结果是可靠的。

我们通过 Pfam 在线分析，Of-PPO 存在 2 个功能结构域，分别为血蓝蛋白 M 和血蓝蛋白 C(图 11)。在许多节肢动物的血淋巴中存在高浓度的血蓝蛋白，它们起到氧载体的作用。节肢动物血蓝蛋白通常有 70 ~ 75 kDa 的亚基组成，包括 2 个铜离子和 1 个氧分子结合位点。血蓝蛋白与昆虫的贮存蛋白(storage protein)、六聚体蛋白、酪氨酸酶和酚氧化酶具有同源性，其中酪氨酸酶和酚氧化酶广泛分布于真菌、植物和动物中，有研究表明血蓝蛋白存在部分 PO 活性(Pless *et al.*, 2003)。通常认为 PPO 在昆虫的类绛色细胞中产生，但如何释放和转移到体壁、中肠、脂肪体等其他组织的具体机理尚不清楚。

跨膜结构的预测对于正确认识蛋白质结构、甚至功能具有重要意义。跨膜结构一般在蛋白质结构中序列相似性不大，但结构却极其类似，因此在序列搜索中可能没有很显著的结果(蒋彦等, 2003)。我们通过 TMHMM 分析了冈比亚安蚊 *A. gambiae* (AJ010193)、烟草天蛾 *M. sexta* PPO1(AF003253)、白腹丛蚊 *A. subalbatus* PPO2(AF286468)、家蚕 *B. mori* PPO1(D49370)、东北大黑鳃金龟 *Holotrichia diomphalia* PPO1(AB079664)、美国白蛾 *Hyphantria cunea* PPO2(AF020391)、斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* PPO(AY703825)和亚洲玉米螟 PPO 推导的氨基酸序列，搜索跨膜蛋白质数据库进行预测都没有发现跨膜结构域。目前有多种预测跨膜螺旋的方法，如

下列资源：TMPRED，PHDhtm，MEMSAT 和 TMHMM 等，这些技术主要是基于对已知跨膜螺旋研究形成的数据库而得到的。由于使用了不同的统计学模型预测跨膜螺旋，他们对于跨膜螺旋和膜向性预测的准确率一般为 80%～95%（张成岗和贺福初，2009）。我们预测认为亚洲玉米螟 PPO 分子也没有信号肽，因而我们认为亚洲玉米螟 PPO 在类绛色细胞中合成后可通过细胞破裂释放到细胞外。

参 考 文 献（References）

Ai HS, Liao JX, Huang DX, Yin ZX, Weng SP, Zhao ZY, Li SD, Yu XQ, He JG, 2009. A novel prophenoloxidase 2 exists in shrimp hemocytes. *Developmental and Comparative Immunology*, 33: 59–68.

Aspán A, Huang T, Cerenius L, Söderhäll K, 1995. cDNA cloning of prophenoloxidase from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* and its activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 939–943.

Cerenius L, Söderhäll K, 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol. Rev.*, 198: 116–126.

Chase MR, Raina K, Bruno J, Sugumaran M, 2000. Purification, characterization and molecular cloning of prophenoloxidase from *Sarcophaga bullata*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30: 953–967.

Feng CJ, Song QS, Lü WJ, Lu JF, 2008. Purification and characterization of hemolymph prophenoloxidase from *Ostrinia furnacalis* Guenée (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 151: 139–146.

Franssens V, Simonet G, Breugelmans B, Van Soest S, Van Hoef V, Vanden Broeck J, 2008. The role of hemocytes, serine protease inhibitors and pathogen-associated patterns in prophenoloxidase activation in the desert locus, *Schistocerca gregaria*. *Peptides*, 29(2): 235–241.

Jiang H, Wang Y, Ma C, Kanost MR, 1997. Subunit composition of pro-phenol oxidase from *Manduca sexta*: Molecular cloning of subunit ProPO-P1. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27: 835–850.

Jiang Y, Wang XX, Cao Y, Wang XZ, 2003. Basic Bioinformatics and Application. Tsinghua University Press, Beijing. 164–184. [蒋彦，王小行，曹毅，王喜忠，2003. 基础生物信息学及应用. 北京：清华大学出版社. 164–184]

Ling E, Yu XQ, 2005. Prophenoloxidase binds to the surface of hemocytes and is involved in hemocyte melanization in *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35: 1 356–1 366.

Matoba Y, Kumagai T, Yamamoto A, Yoshitsu H, Sugiyama M, 2006. Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis. *J. Biol. Chem.*, 281(13): 8 981–8 990.

Parkinson N, Smith I, Weaver R, Edwards JP, 2001. A new form of arthropod phenoloxidase is abundant in venom of the parasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31: 57–63.

Pless DD, Aguilar MB, Falcön A, Lozano-Alvarez E, de la Cotera HEP, 2003. Latent phenoloxidase activity and N-terminal amino acid sequence of hemocyanin from *Bathynomus giganteus*, a primitive crustacean. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 409: 402–410.

Sánchez D, Ganfornina MD, Gutiérrez G, Bastiani MJ, 1998. Molecular characterization and phylogenetic relationships of a protein with potential oxygen-binding capabilities in the grasshopper embryo. A hemocyanin in insects? *Mol. Biol. Evol.*, 15(4): 415–426.

Söderhäll K, Cerenius L, 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 10: 23–28.

Tsao LY, Lin US, Christensen BM, Chen CC, 2009. *Armigeres subalbatus* prophenoloxidase III: Cloning, characterization and potential role in morphogenesis. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 39: 96–104.

Xue QZ, 2009. Tools for Analysis of DNA and Protein Sequence Data. Science Press, Beijing. 72–98. [薛庆中，2009. DNA 和蛋白质序列数据分析工具. 北京：科学出版社. 72–98]

Yamamoto K, Yakiyama M, Fujii H, Kusakabe T, Koga K, Aso Y, Ishiguro M, 2000. Expression of prophenoloxidase mRNA during silkworm hemocyte development. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64: 1 197–1 202.

Yang Q, 2008. Bioinformatics analysis of focal dehension kinase in different animals. *Journal of Xi'an Technological University*, 28(4): 367–371. [杨琦，2008. 黏着斑激酶生物信息学分析. 西安工业大学学报，28(4)：367–371]

Zhang CG, He FC, 2002. The Method and Practice of Bioinformactics. Science Press, Beijing. 110–140. [张成岗，贺福初，2009. 生物信息学方法与实践. 北京：科学出版社. 110–140]

（责任编辑：邓艳）